

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re patent application of:

Rieping, *et al.*

Appl. No.: to be assigned

Filed: herewith

For: **Process for the Production of
L-Amino Acids Using Strains of
the Enterobacteriaceae Family**

Art Unit: to be assigned

Examiner: to be assigned

Atty. Dkt.: 7909/84003

**Submission of Priority Document
in Accordance with the Requirements of Rule 55**

Commissioner of Patents
U.S. Patent and Trademark Office
2011 South Clark Place
Customer Window, **MS Patent Application**
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03
Arlington, VA 22202

Sir:

Please accept the enclosed certified copy of priority documents DE 103 16 109.0, filed on April 9, 2003, for which benefit under 35 U.S.C. § 119/365 is being claimed in the above-captioned application. In the event priority to the enclosed foreign application has not been claimed, it is claimed hereby.

Respectfully submitted,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

By



Michael A. Sanzo
Reg. No. 36,912
Attorney for Applicants

Date April 5, 2004
1801 K Street, N.W., Suite 401L
Washington, DC 20006-1201
Phone: (202) 419-7013

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 16 109.0

Anmeldetag: 09. April 2003

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen
der Familie Enterobacteriaceae

IPC: C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

100000

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin,
5 unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen mindestens der offene Leserahmen (ORF) yfiD und/ oder das pflB-Gen, verstärkt wird (werden).

Stand der Technik

10 L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Aminosäuren durch Fermentation von
15 Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung
20 und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst
25 betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das
30 Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne

5 Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht. Zusammenfassende Informationen zur Zell- und Molekularbiologie von Escherichia coli und Salmonella sind in Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular

10 Biology, 2nd edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1995) zu finden.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-

15 Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der

20 Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens der offene Leserahmen yfiD und/ oder das pflB-Gen, oder für deren Genprodukt kodierende Nukleotidsequenz(en) oder Allele verstärkt , insbesondere überexprimiert wird (werden).

25 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-

30 Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder

mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene, des ORFs bzw. der ORFs um mindestens eine (1) Kopie erhöht,
5 einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Als offener Leserahmen (ORF, open reading frame) wird ein
10 Abschnitt einer Nukleotidsequenz bezeichnet, der für ein Protein beziehungsweise Polypeptid oder Ribonukleinsäure kodiert oder kodieren kann, dem (der) nach dem Stand der Technik keine Funktion zugeordnet werden kann. Nach Zuordnung einer Funktion zu dem betreffenden Abschnitt der
15 Nukleotidsequenz wird im allgemeinen von einem Gen gesprochen. Unter Allelen versteht man im allgemeinen alternative Formen eines gegebenen Gens. Die Formen zeichnen sich durch Unterschiede in der Nukleotidsequenz aus.

20 Als Genprodukt bezeichnet man im Allgemeinen das von einer Nukleotidsequenz, d.h. einem ORF, einem Gen oder einem Allel kodierte Protein oder die kodierte Ribonukleinsäure.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des
25 entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die Aktivität oder Konzentration im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung
30 von L-Aminosäuren durch Fermentation von insbesondere rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) die die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man das den yfiD-ORF und/oder das pflB-Gen oder für die Genprodukte kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere
5 überexprimiert, in einem Medium kultiviert unter Bedingungen, bei denen die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird, und
- b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe
10 und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (> 0 bis 100 %) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.

Die rekombinanten Mikroorganismen, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus
15 Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und
20 Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der
25 Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- Escherichia coli H4581 (EP 0 301 572)
- Escherichia coli KY10935 (Technical Research Laboratories 61(11): 1877-1882 (1997))
- 30 - Escherichia coli VNIIGenetika MG442 (US-A-4278,765)
- Escherichia coli VNIIGenetika M1 (US-A-4,321,325)

- *Escherichia coli* VNIIGenetika 472T23 (US-A-5,631,157)
- *Escherichia coli* BKIIM B-3996 (US-A-5,175,107)
- *Escherichia coli* kat 13 (WO 98/04715)
- *Escherichia coli* KCCM-10132 (WO 00/09660)

5 Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Serratia*, insbesondere der Art *Serratia marcescens* sind beispielsweise

- *Serratia marcescens* HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))
- 10 - *Serratia marcescens* TLr156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
- *Serratia marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992))

- L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der
- 15 Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz
- 20 gegen Diaminobornsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Cyclopentan-Carboxylsäure, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen
- 25 Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin,
- 30 Resistenz gegen Threonin-Raffinat, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-

- Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber
- 5 Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der
- 10 Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthese, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form,
- 15 Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.
- 20 Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Verstärkung, insbesondere Überexpression des offenen Leserahmens yfiD und/ oder des pflB-Gens oder für die entsprechenden Genprodukte kodierenden Nukleotidsequenz(en) oder Allele, in
- 25 verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

- Die Nukleotidsequenzen der Gene oder offenen Leserahmen (ORF) von Escherichia coli gehören zum Stand der Technik und können der von Blattner et al. (Science 277: 1453-1462
- 30 (1997)) publizierten Genomsequenz von Escherichia coli entnommen werden.

Der offene Leserahmen yfiD und das von diesem ORF kodierte Protein, wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung: offener Leserahmen
Funktion: putative Format-Acetyltransferase
Referenz: Blankenhorn et al.; Journal of Bacteriology
181(7): 2209-2216 (1999)
5 Fountoulakis et al.; Electrophoresis 20(11):
2181-2195 (1999)
Kirkpatrick et al.; Journal of Bacteriology
183(21): 6466-6477 (2001)
Wyborn et al.; Microbiology 148: 1015-1026
10 (2002)
Accession No.: AE000344

Das pflB-Gen und das von diesem Gen kodierte Protein, wird
unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung: Format-Acetyltransferase I, Pyruvat Format-
15 Lyase I
EC-Nr.: 2.3.1.54
Referenz: Rodel et al.; European Journal of
Biochemistry 177(1): 153-158 (1988)
Wagner et al.; Proceedings of the National
20 Academy of the United States of America
89(3): 996-1000 (1992)
Accession No.: AE000192
Alternativer Genname: pfl

Die Pyruvat Format-Lyase aus Salmonella typhimurium wird
25 unter anderem in folgender Referenz beschrieben: Wong et
al.; Journal of Bacteriology 171(9): 4900-4905 (1989)

Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des
National Center for Biotechnology Information (NCBI) der
National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der
30 Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies
Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge,
UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan)
entnommen werden.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen offenen Leserahmen können erfindungsgemäß verwendet werden.

Weiterhin können Allele der Gene oder offenen Leserahmen verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des

- 5 genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“) ergeben. Die Verwendung endogener Gene oder endogener offener Leserahmen wird bevorzugt.

- 10 Zu den Allelen, welche funktionsneutrale Sinnmutationen enthalten, zählen unter anderem solche, die zu mindestens einem konservativen Aminosäureaustausch in dem von ihnen kodierten Protein führen.

- Bei den aromatischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Phenylalanin, Tryptophan und
- 15 Tyrosin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den hydrophoben Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Leucin, Isoleucin und Valin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den polaren Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Glutamin und
- 20 Asparagin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den basischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Arginin, Lysin und Histidin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den sauren Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Asparaginsäure und
- 25 Glutaminsäure gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den Hydroxyl-Gruppen enthaltenden Aminosäuren spricht man von konservativen Austauschen wenn Serin und Threonin gegeneinander ausgetauscht werden.

- In gleicher Weise können auch solche Nukleotidsequenzen
- 30 verwendet werden, die für Varianten der genannten Proteine kodieren, die zusätzlich am N- oder C-Terminus eine Verlängerung oder Verkürzung um mindestens eine (1) Aminosäure enthalten. Diese Verlängerung oder Verkürzung beträgt nicht mehr als 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 oder 2
- 35 Aminosäuren oder Aminosäurereste

Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder offenen Leserahmen oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

- 5 Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder offenen Leserahmen oder Allele oder die katalytischen oder regulatorischen Eigenschaften (Aktivität) der Proteine erhöht werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.
- 10 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise
- 15 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer
- 20 der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in extrachromosomal replizierenden Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl
- 25 vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei
- 30 Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)),
- 35 bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), in

PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z.B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens den yfiD-ORF und/ oder das pflB-Gen oder für deren Genprodukte kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele trägt.

Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme einer isolierten Nukleinsäure durch einen Wirt (Mikroorganismus).

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression der jeweiligen Gene oder offenen Leserahmen betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Nähere Erläuterungen zu den Begriffen der Genetik und Molekularbiologie findet man in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Birge (Bacterial and Pacteriophage Genetics, 4th ed., Springer Verlag, New York (USA), 2000) oder dem Lehrbuch von Stryer (Biochemistry, 3rd ed., Freeman and Company, New York (USA), 1988) oder dem Handbuch von Sambrook et al. (Molekular Cloning, A Laboratory Manual,

2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 1989).

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie

- 5 Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des yfiD-ORFs und bzw. oder des pflB-Gens, ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-
- 10 Dinukleotid-Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren. Die Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.
- So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere
 - 15 der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
 - das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
 - das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen von
 - 20 Corynebacterium glutamicum (WO 99/18228),
 - das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),
 - das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende
 - 25 ppc-Gen (Gene 31: 279-283 (1984)),
 - die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
 - das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB
 - 30 (EP-A-0 994 190),

- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mgo-Gen (WO 02/06459),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- 5 • das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen von *Corynebacterium glutamicum* (WO 01/92545),
- das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- 10 • das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende hns-Gen (WO 03/004671),
- das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen (WO 03/004598),
- 15 • das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen (WO 03/004664),
- das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsH-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- 20 • das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsI-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende crr-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- 25 • das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen (WO 03/004670),
- das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen (WO 03/004665),
- das für den globalen Regulator Csr kodierende csrA-Gen (Journal of Bacteriology 175: 4744-4755 (1993)),

- das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen (Nucleic Acids Research 16: 7995-8009 (1988)),
- das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen (Journal of Bacteriology 172: 2642-2649 (1990)),
- das für das 10 Kd Chaperon kodierende mopB-Gen (WO 03/004669), das auch unter der Bezeichnung groES bekannt ist,
- das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen (WO 03/006666),
- das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen (WO 03/006666),
- das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für den positiven Regulator PhoB des pho Regulons kodierende phoB-Gen des phoBR-Operons (WO 03/008606),
- das für das Sensorprotein des pho Regulons kodierende phoR-Gen des phoBR-Operons (WO 03/008606),

- das für das Protein E der äusseren Zellmembran kodierende phoE-Gen (WO 03/008608),
- das für die, durch Fructose stimulierte, Pyruvat Kinase I kodierende pykF-Gen (WO 03/008609),
- 5 • das für die 6-Phosphofructokinase II kodierende pfkB-Gen (WO 03/008610),
- das für das periplasmatische Bindeprotein des Maltose-Transports kodierende malE-Gen (WO 03/008605),
- 10 • das für die Superoxiddismutase kodierende sodA-Gen (WO 03/008613),
- das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- 15 • das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
- das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
- 20 • das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen des suc ABCD-Operons (WO 03/008615),
- das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008615),
- 25 • das für die Adenylat-Kinase kodierende adk-Gen (Nucleic Acids Research 13(19): 7139-7151 (1985)),
- das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeA-Gen (Journal of Bacteriology 175(23): 7747-7748 (1993)),

- das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeB-Gen (Journal of Bacteriology 175(23): 7747-7748 (1993)),
- 5 • das für die Isocitrat-Dehydrogenase kodierende icd-Gen (Journal of Biological Chemistry 262(22): 10422-10425 (1987)),
- das für das periplasmatische, Galaktose-bindende Transportprotein kodierende mglB-Gen (Molecular and General Genetics 229(3): 453-459 (1991)),
- 10 • das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodierende lpd-Gen (European Journal of Biochemistry 135(3): 519-527 (1983)),
- das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen (European Journal of Biochemistry 133(1): 155-162 (1983)),
- 15 • das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen (European Journal of Biochemistry 133(3): 481-489 (1983)),
- das für die Aminopeptidase B kodierende pepB-Gen (Journal of Fermentation and Bioengineering 82: 392-397 (1996))
- 20 • das für die Aldehyd-Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.3) kodierende aldH-Gen (Gene 99(1): 15-23 (1991)),
- das für das Eisen-Speicher-Homoprotein (Bacterioferritin) kodierende bfr-Gen (Journal of Bacteriology 171(7): 3940-3947 (1989))
- 25 • das für die Uridin-Phosphorylase kodierende udp-Gen (Nucleic Acids Research 17(16): 6741 (1989)) und

- das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997)),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

5 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des yfiD-ORF und/ oder des pflB-Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- 10 • das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- 15 • das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) WO 02/29080),
- 20 • das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)), WO 02/29080),
- das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (WO 02/29080)
- 25 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (WO 02/36797)
- das für das Enzym Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen (WO 02/081722),
- 30 • das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (WO 02/081721), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist,

- das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (WO 02/081698), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,
- 5 • das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen (WO 01/05939), das auch unter der Bezeichnung katF-Gen bekannt ist,
- das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen (WO 03/008603) und
- 10 • das für die Malatsynthase A kodierende aceB-Gen (WO 03/008604)

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der
15 intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw.
20 Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym bzw. Protein oder offenen Leserahmen oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität
25 oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

30 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des yfiD-ORFs und/oder des pflB-Gens,

unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- 5 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im batch - Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im
- 10 Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- 15 Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology
- 20 (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett,
- 25 Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.
- 30 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und

Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder
5 die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können
essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine
10 zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert
15 werden.

Die Fermentation wird im Allgemeinen bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,0, insbesondere 6,0 bis 8,0, durchgeführt. Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.
20 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem
25 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise
30 bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958))

- 5 beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

- Das erfindungsgemäße Verfahren dient bevorzugt zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie
- 10 beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch
Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der
Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet,
5 dass man
 - a) die die gewünschte L-Aminosäure produzierenden
Mikroorganismen, in denen man den yfiD-ORF und/oder
das pflB-Gen oder für die Genprodukte kodierende
Nukleotidsequenzen überexprimiert, in einem Medium
10 kultiviert unter Bedingungen, bei denen die
gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den
Zellen angereichert wird, und
 - b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei
gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe
15 und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder
Anteilen (> 0 bis 100 %) im isolierten Produkt
verbleiben oder vollständig entfernt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
20 dass man rekombinante Mikroorganismen einsetzt, die
man durch die Transformation eines Mikroorganismus der
Familie Enterobacteriaceae mit einem Vektor erzeugt,
wobei der Vektor den yfiD-ORF und/oder das pflB-Gen
enthält.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
25 dass in den rekombinanten Mikroorganismen die
Kopienzahl des Gens/der Gene und/oder ORF um
mindestens 1 erhöht vorliege(n).
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
30 dass die Erhöhung der Kopienzahl des yfiD-ORF's und/
oder des pflB-Gens um mindestens 1 durch Integration
des Gens in das Chromosom des Mikroorganismus erzielt
wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der Kopienzahl des yfiD-ORF's und/oder des pflB-Gens um mindestens 1 durch einen extrachromosomal replizierenden Vektor erzielt wird.
- 5 6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erzielung der Überexpression
 - a) die Promoter- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle stromaufwärts des yfiD-ORF's und/ oder des pflB-Gens mutiert, oder
 - 10 b) Expresssionskassetten oder Promotoren stromaufwärts des yfiD-ORF's und/ oder des pflB-Gens einbaut.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man einen yfiD-ORF und/oder ein pflB-Gen verwendet, dass unter der Kontrolle eines Promoters
15 steht.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man durch die Verstärkung des yfiD-ORF's und/oder pflB-Gens die Konzentration oder Aktivität des YfiD- und oder PflB-Genproduktes (Proteins) um mindestens 10%
20 erhöht, bezogen auf die Aktivität oder Konzentration des Genproduktes im Ausgangsstamm.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia
25 einsetzt.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt, insbesondere
30 überexprimiert.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet,
dass man zur Herstellung von L-Threonin Mikroorganismen
der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen
man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der
5 Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

11.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-
Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die
Threoninsynthese kodierende thrABC-Operon,

10 11.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-
Gen,

11.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase
kodierende pps-Gen,

11.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
kodierende ppc-Gen,

15 11.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene
pntA und pntB,

11.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,

11.7 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase
kodierende mqo-Gen,

20 11.8 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,

11.9 das für das Threoninexport-Protein kodierende
thrE-Gen,

11.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende
gdhA-Gen,

25 11.11 das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende
hns-Gen,

11.12 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-
Gen,

- 11.13 das für die Fructose Biphosphat Aldolase
kodierende fba-Gen,
- 11.14 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-
Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,
- 5 11.15 das für das Enzym I des Phosphotransferase-
Systems kodierende ptsI-Gen,
- 11.16 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente
kodierende crr-Gen,
- 10 11.17 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente
kodierende ptsG-Gen,
- 11.18 das für den Regulator des Leucin-Regulons
kodierende lrp-Gen,
- 11.19 das für den globalen Regulator Csr kodierende
csrA-Gen,
- 15 11.20 das für den Regulator des fad-Regulons
kodierende fadR-Gen,
- 11.21 das für den Regulator des zentralen
Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen,
- 11.22 das für das 10 Kd Chaperon kodierende mopB-Gen,
- 20 11.23 das für die kleine Untereinheit der Alkyl
Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,
- 11.24 das für die große Untereinheit der Alkyl
Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,
- 25 11.25 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-
Gen,
- 11.26 das für den Regulator des cys-Regulons
kodierende cysB-Gen,

- 11.27 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen,
- 11.28 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen,
- 5 11.29 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen,
- 11.30 das für den positiven Regulator PhoB des pho Regulons kodierende phoB-Gen,
- 10 11.31 das für das Sensorprotein des pho Regulons kodierende phoR-Gen,
- 11.32 das für das Protein E der äusseren Zellmembran kodierende phoE-Gen,
- 11.33 das für die, durch Fructose stimulierte, Pyruvat Kinase I kodierende pykF-Gen,
- 15 11.34 das für die 6-Phosphofructokinase II kodierende pfkB-Gen,
- 11.35 das für das periplasmatische Bindeprotein des Maltose-Transports kodierende malE-Gen,
- 20 11.36 das für die Superoxiddismutase kodierende sodA-Gen,
- 11.37 das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen,
- 11.38 das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen,
- 25 11.39 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,

- 11.40 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,
- 5 11.41 das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen,
- 11.42 das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,
- 11.43 das für die Adenylat-Kinase kodierende adk-Gen,
- 10 11.44 das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeA-Gen,
- 11.45 das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeB-Gen,
- 15 11.46 das für die Isocitrat-Dehydrogenase kodierende icd-Gen,
- 11.47 das für das periplasmatische, Galaktose-bindende Transportprotein kodierende mglB-Gen,
- 20 11.48 das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodierende lpd-Gen,
- 11.49 das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen,
- 11.50 das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen,
- 25 11.51 das für die Amino-peptidase B kodierende pepB-Gen,
- 11.52 das für die Aldehyd-Dehydrogenase kodierende aldH-Gen,

- 11.53 das für das Eisen-Speicher-Homoprotein
kodierende bfr-Gen,
- 11.54 das für die Uridin-Phosphorylase kodierende
udp-Gen und
- 5 11.55 das für den Regulator der SigmaE-Faktor-
Aktivität kodierende rseB-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
verringern.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man zur Herstellung von L-Threonin Mikroorganismen
der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen
man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der
Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 20 13.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende
tdh-Gen,
- 13.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-
Gen,
- 13.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf)
yjfA,
- 25 13.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf)
ytfP,
- 13.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende pckA-Gen,
- 30 13.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-
Gen,

- 13.7 das für die Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen,
- 13.8 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
- 5 13.9 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
- 13.10 das für den Sigma38-Faktor kodierende rpoS-Gen,
- 13.11 das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen
- 10 13.12 das für die Malatsynthase A kodierende aceB-Gen
- abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.
14. Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung Escherichia, in denen der
- 15 yfiD-ORF und oder das pflB-Gen oder für deren Genprodukt kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert, vorliegen.
15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Aminosäuren, ausgewählt aus
- 20 der Gruppe L-Asparagin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin herstellt.
16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Aminosäuren, ausgewählt aus
- 25 der Gruppe L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin herstellt.
17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Threonin herstellt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, dadurch
5 gekennzeichnet, dass man

- 10 a) die die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man den yfiD-ORF und/oder das pflB-Gen oder für die Genprodukte kodierende Nukleotidsequenzen überexprimiert, in einem Medium kultiviert unter Bedingungen, bei denen die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird, und
- 15 b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen (> 0 bis 100 %) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.